

# ‘石硖’龙眼大果型桂花味芽变系的 RAPD 分析鉴定

肖璇<sup>1</sup> 孙敏<sup>1\*</sup> 王心燕<sup>2</sup> 乔爱民<sup>2</sup> 江波<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715; <sup>2</sup>仲恺农业技术学院园艺系, 广州 510225)

**摘要:** 用 160 个 10 bp 单个和混和随机引物对 ‘石硖’ 龙眼大果型桂花味芽变母树芽变枝及普通枝的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增分析, 从中筛选出 6 个单引物 (S71、S161、S303、S304、S341、S1212) 和 4 个双引物 (Z7、Z59、Z60、Z70) 能在二者之间扩增出稳定的多态性片段。10 个引物共扩增出 99 条片段, 其中多态性片段有 S71-560、S161-813、Z70-800 等 13 条, 占 13.1%, 表明芽变枝果实大小及风味的变化与其遗传物质的改变密切相关。用两个特异引物 S71、Z70 对来源于同一芽变枝不同树龄的芽变嫁接单株及对照进行 RAPD 扩增, 所得特异片段与引物筛选中完全一致, 进一步表明芽变引起的遗传物质的改变可以通过无性繁殖的方式稳定存在, 利用特异引物可对芽变嫁接单株的结果性状做早期预测。

**关键词:** 龙眼; 芽变; RAPD

中图分类号: S 667.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 04-0684-04

## Identification of Large Fruit and Sweet Osmanthus Flavour Sport from ‘Shixia’ Longan Using RAPD Marker

Xiao Xuan<sup>1</sup>, Sun Min<sup>1\*</sup>, Wang Xinyan<sup>2</sup>, Qiao Aimin<sup>2</sup>, and Jiang Bo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China; <sup>2</sup>Department of Horticulture, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** Genetic DNA s from ‘Shixia’ longan (*Dimocarpus longana* Lour.) and its sport line which could generate larger fruits containing sweet osmanthus flavour were amplified by RAPD with 160 10 bp single and mixed random primers to study the genetic substance change of the sport. Six single and four mixed primers were screened which could produce stable polymorphic segments between the two clones. 13 out of the total 99 fragments amplified were distinctive including the loss of a normal segment and appearance of a new one. The polymorphic fragments amplified were S71-560, S161-813, Z70-800, etc. The difference of amplified DNA segments showed that the large fruit and sweet osmanthus mutant was closely related to changes of some genetic substances in the sport line. Further studying also showed that the genotype of the sport could be inherited stably by way of asexual propagation. The polymorphic segments could be used to forecast the fruit characters of the grafted seedlings from the sport scion.

**Key words:** Longan; *Dimocarpus longana*; Sport; RAPD

## 1 目的、材料与方法

‘石硖’龙眼 (*Dimocarpus longana* Lour. ‘Shixia’) 是广东省龙眼的主栽品种之一, 但果实偏小, 多年来育种工作者试图提高龙眼的单果质量, 但尚未有明显进展。

1985 年在广东省台山市红岭种子园发现 1 棵 ‘石硖’ 龙眼结果树一主枝上所结果实比普通 ‘石硖’ 龙眼重 26% ~ 31%, 且具特有的桂花香味, 历经多年的高接和小苗嫁接繁殖试验, 发现其性状十分稳定, 初步认为是芽变优系。本研究以该 ‘石硖’ 龙眼芽变母树上的芽变枝及普通枝为材料,

收稿日期: 2004 - 10 - 09; 修回日期: 2005 - 03 - 14

基金项目: 广东省教育厅自然科学研究项目 (0153)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jwcm@swnu.edu.cn)

提取其基因组 DNA 进行 RAPD 扩增分析, 旨在将芽变与其原类型从 DNA 分子水平上加以区分。

由芽变母枝 (Y) 上随机选取 6 个芽变嫁接单株 [ $Y_1$ ,  $Y_2$  (4 年生);  $Y_3$ ,  $Y_4$  (3 年生);  $Y_5$ ,  $Y_6$  (2 年生)], 其中  $Y_1$ 、 $Y_2$  由 Y,  $Y_3$ 、 $Y_4$  由  $Y_1$ ,  $Y_5$ 、 $Y_6$  由  $Y_3$  嫁接获得, 所用砧木均为 '石硖'。所有材料均由广东省台山市红岭种子园提供, 2004 年 3 月上旬采回幼叶, 液氮保存。

基因组 DNA 的提取和纯化按张虎平等<sup>[1]</sup>的方法进行。设计不同的 DNA 模板、 $Mg^{2+}$ 、dNTP、随机引物、Taq 酶浓度梯度, 对反应条件进行优化。所用试剂和引物均购自上海生工生物工程有限公司。在 PE2400 型 PCR 仪 (美国 PE 公司) 上进行扩增, 反应热循环程序参照刘成明等的方法<sup>[2]</sup>。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶上电泳分离, EB 染色, 在紫外透射仪上观察, 照相。具多态性的引物重复扩增 3 次。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 反应体系优化及多态性引物的筛选

在本试验使用的 PCR 仪型号及扩增程序下, 获得稳定、清晰的扩增结果反应体系为 25  $\mu$ L 的反应体积中含有 20 ng 模板, 1.0 U Taq DNA 聚合酶, 2.0 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.20 mmol/L dNTP, 0.20  $\mu$ mol/L 引物, 1  $\times$ buffer, 其余用双蒸水补齐。

在 80 个 10 bp 的单引物及 80 个双引物中, 有 90% 的引物能扩增出清晰的条带, 一般为 3~12 条片段, 介于 200~4 000 bp 之间。大多数引物在芽变枝与普通枝间的扩增产物完全相同或相似; 有 6 个单引物及 4 个双引物 (表 1) 在芽变枝和普通枝间均能扩增出 1~2 条清晰、稳定的多态性片段。

表 1 多态性随机引物的序列及扩增结果

Table 1 The sequences of the polymorphic primers and their amplification

| 引物 Primer           | 碱基序列<br>Nucleotide sequence (5' 3') | 扩增片段数<br>Total fragments amplified | 区分性多态性片段<br>Polymorphic fragments |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| S71                 | AAAGCTGCGG                          | 9                                  | S71-560                           |
| S161                | ACCTGGACAC                          | 7                                  | S161-813                          |
| S303                | TGGCGCATGTG                         | 7                                  | S303-200                          |
| S304                | CCGCTACCGA                          | 12                                 | S304-564, S304-900                |
| S341                | CCCGGCATAA                          | 16                                 | S341-1400, S341-1700              |
| S1212               | GGA TCGTCGG                         | 13                                 | S1212-1160                        |
| Z7 (S123 + S510)    | CCTGATCACC + CCATTCCCCA             | 9                                  | Z7-700                            |
| Z59 (S426 + S433)   | GAGACGCACA + ACGGTCACTC             | 8                                  | Z59-700, Z59-1000                 |
| Z60 (S433 + S465)   | ACGTCACTC + CCCC GGTAAC             | 11                                 | Z60-1470                          |
| Z70 (S1315 + S1345) | CCAGTCCCAA + TCGCTGCGTT             | 7                                  | Z70-800                           |

由图 1 可知, 与对照 (普通枝) 相比, 母树芽变枝中新产生的片段有: S71-560、S161-813、S341-1700、Z7-700、Z59-1000、Z70-800; 母树芽变枝中缺失的片段有: S303-200、S304-900、S304-564、S341-1400、S1212-1160、Z59-700、Z60-1470。由此可见 '石硖' 龙眼母树芽变枝与其对照普通枝相比在 DNA 分子的序列上发生了变化。

果树芽变大致可分为 DNA 序列上的改变 (如染色体易位、基因突变等) 和非 DNA 序列上的改变 (如染色体数目变异、DNA 甲基化等), 前者可能被 RAPD 标记鉴别出来。RAPD 技术应用于芽变鉴定的研究已有相关报道, 但鉴定的难易随变异类型及程度的不同而有所差别<sup>[3~5]</sup>。本试验以同一母树上的芽变枝和普通枝为材料, 从 80 个单引物及 80 个双引物中分别筛选出 6 个单引物和 4 个双引物在芽变品种及对照间表现出稳定的多态性, 多态性条带达 13 条, 其引物检出率和多态性片段数远高于其它芽变的 RAPD 鉴定结果<sup>[6]</sup>, 表明本试验中所研究材料的芽变类型很可能属于基因突变。

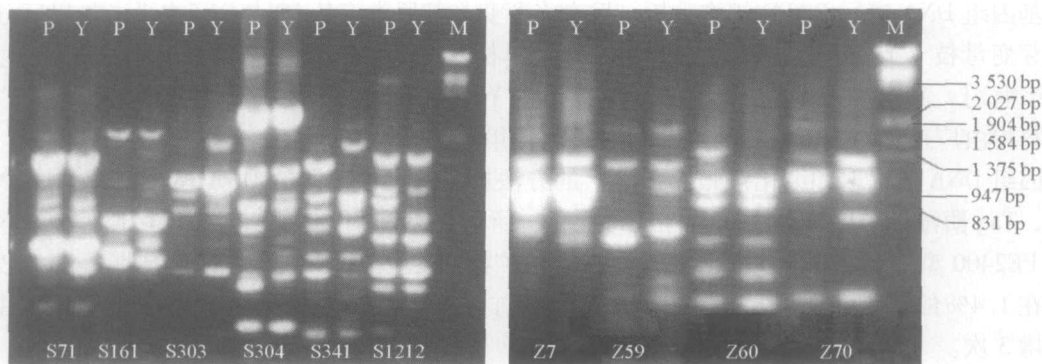


图 1 10个多态性随机引物的 RAPD 扩增指纹图谱

左: 单引物; 右: 双引物。P: 对照普通枝, Y: 芽变枝; M: DNA/EcoR + Hind, 下同。

Fig 1 The RAPD profile amplified by the 10 polymorphic primers

Left: Single primers; Right: Double primers P: Control; Y: Sport; M: DNA/EcoR + Hind The same below.

由图 2 可知, 由引物筛选中表现为单态性的单引物重新两两组合而成的双引物也能在芽变枝及其对照间扩增出稳定清晰的多态性片段。因此, 利用两个单引物重新组合成双引物用于扩增是弥补引物不足和降低实验成本的可行方法。

## 2.2 普通‘石硤’与芽变的遗传相似性分析

理论上芽变和对照的遗传背景应高度一致。本研究中计算二者间的相似系数为  $86.87\% [(43 \times 2) / (53 + 46) \times 100\%]$ , 低于刘成明等<sup>[2]</sup>类似研究的结果, 表明本研究中的芽变类型变异程度比较大。

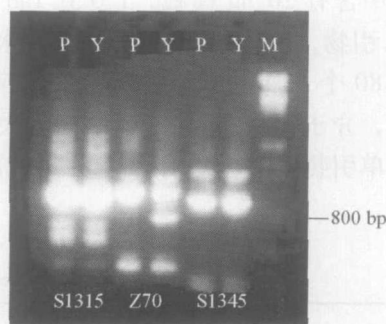


图 2 双引物 Z70 (S1315 + S1345) 的 RAPD 扩增

Fig 2 The RAPD profile amplified by Z70 (S1315 + S1345)

## 2.3 芽变的遗传稳定性

以芽变母树普通枝和芽变枝分别做阴性和阳性对照, 选用特异引物 S71、Z70 研究芽变所发生的遗传物质的改变在嫁接繁殖中的遗传稳定性。从图 3 可以看出, 6 个芽变嫁接单株 ( $Y_1 \sim Y_6$ ) 的扩增带型与母树芽变枝 (阳性对照) 完全一样, 表明芽变所引起的遗传物质改变可通过无性繁殖的方式稳定遗传。实际上,  $Y_1$  和  $Y_2$  单株所结果实均具‘大果型’及‘桂花香味’特征, 表明芽变基因不仅可通过无性繁殖的方式稳定存在, 而且稳定表达。

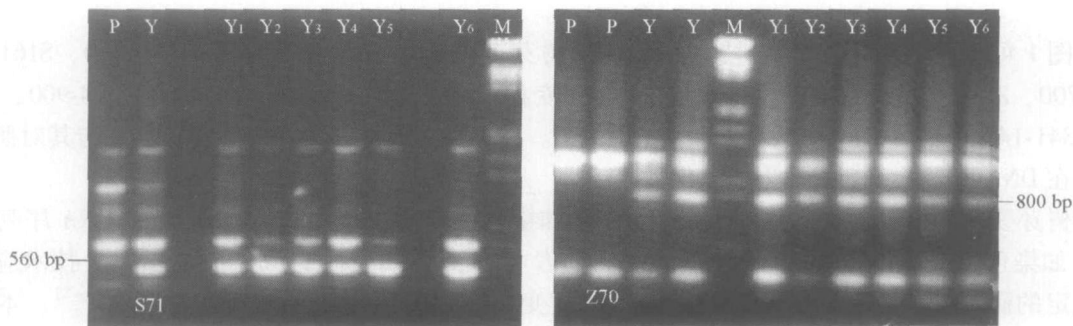


图 3 引物 S71 和 Z70 对芽变系及普通石硤的 RAPD 扩增图谱

$Y_1 \sim Y_6$ : 芽变嫁接单株 ( $Y_1$  和  $Y_2$ : 4 年生,  $Y_3$  和  $Y_4$ : 3 年生,  $Y_5$  和  $Y_6$ : 2 年生)。

Fig 3 The RAPD profile of sport line and its maternal plant

$Y_1 \sim Y_6$ : Grafted plants ( $Y_1, Y_2$ : Four years old;  $Y_3, Y_4$ : Three years old;  $Y_5, Y_6$ : Two years old).

本试验结果证明芽变遗传类型可通过无性繁殖的方式稳定遗传, 但芽变也有可能以嵌合体的方式存在, 即同一器官中可能同时存在芽变类型组织和原品种类型组织<sup>[7]</sup>, 这样芽变品种有可能恢复到原品种类型。用 RAPD 来分析芽变品种的遗传背景不受时间、生长发育时期及环境的影响, 因此, 可利用特异的芽变分子标记对嫁接小苗进行早期结果性状预测以减少经济上的损失。

### 参考文献:

- 1 张虎平, 牛建新, 王国安, 虎海防, 马兵钢. 适于核桃基因标记的 DNA 提取方法. 生物技术, 2003, 13 (5): 18~19  
Zhang H P, Niu J X, Wang G A, Hu H F, Ma B G. Optimal DNA extraction method for gene mark in walnuts. Biotechnology, 2003, 13 (5): 18~19 (in Chinese)
- 2 刘成明, 梅曼彤. 利用 RAPD 分析鉴别荔枝的焦核突变体. 园艺学报, 2002, 29 (1): 57~59  
Liu C M, Mei M T. Identification of stenopermocarp mutants of litchi by RAPD analysis. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (1): 57~59 (in Chinese)
- 3 Nybom H. DNA fingerprints of 'Red Delicious' apples. Hortscience, 1990, 25: 1641~1642
- 4 Ye G N, Soylmezoglu G, Weden N F. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprint. Vitis, 1998, 37: 33~38
- 5 Hong Yuyang, Hanna Schmidt. Selection of a mutant from adventitious shoot formed in X-ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. Euphytica, 1994, 77: 89~92
- 6 金勇丰, 张耀洲, 陈大明, 张上隆. 桃早熟芽变品种 '大观一号' 的 RAPD 分析及特异片段的克隆. 果树科学, 1998, 15 (2): 103~106  
Jin Y F, Zhang Y Z, Cheng D M, Zhang S L. Identification of peach early-ripening mutant 'Daguang 1' by RAPD markers and cloning of specific fragment. Journal of Fruit Science, 1998, 15 (2): 103~106 (in Chinese)
- 7 尹永胜, 徐增凯, 张爱波, 杨素珍, 王强生. 巴厘四倍体芽变品种的选育. 中国农学通报, 1996, 12 (5): 22~23  
Yin Y S, Xu Z K, Zhang A B, Yang S Z, Wang Q S. Study on selection and breeding of new varieties of bud mutation of 'Barlett' pear. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1996, 12 (5): 22~23 (in Chinese)

## 欢迎订阅 2006 年下列期刊

《中国生态农业学报》(原刊名《生态农业研究》)是由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办的大农业学术期刊, 科学出版社出版, 主要刊登生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔及资源与环境保护等领域创新的研究学术论文、研究技术报告、研究简报及综述、生态省(市)建设、生态农业建设和生态示范区建设典型模式与典型经验等, 适于国内外从事生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔、资源与环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生、管理工作者和基层从事生态农业建设的广大技术人员等阅读与投稿。国内外公开发行, 季刊, 国际标准大 16 开本, 每期定价 14.60 元, 全年 58.40 元。邮发代号: 82-973, 全国各地邮局均可订阅, 漏订者可直接汇款至编辑部补订(全年需另加邮资 12.00 元)。地址: 河北省石家庄市槐中路 286 号《中国生态农业学报》编辑部, 邮编: 050021, 电话: 0311-85818007。

《中国瓜菜》(原名《中国西瓜甜瓜》)是由中国农业科学院郑州果树研究所主办的技术性期刊, 主导栏目有百家论坛、试验研究与简报、品种选育、专题综述、栽培与植保等, 并有市场动态、产业发展等小栏目 10 多个。2006 年为双月刊, 每期定价 4.50 元, 全年 6 期共 27.00 元。邮发代号: 36-143; 也可汇款至本刊发行部订阅。地址: 河南省郑州市航海东路南·中国农业科学院郑州果树研究所杂志社, 邮编: 450009, 编辑部电话: 0371-65330927, 广告部电话: 0371-65330926/49, 发行部电话: 0371-65330982, E-mail: zggc@163.com; zgxtg@163.com。

《植物营养与肥料学报》为中国植物营养与肥料学会主办, 国内外公开发行的专业性学术刊物。主要报道本学科具有创新性的学术论文, 新技术和新方法研究报告、简报、文献评述和问题讨论等。其主要包括土壤、肥料和作物间的关系, 养分变化和平衡; 各种肥料在土壤中的变化规律和配施原理; 农作物遗传种质特性对养分反应; 作物根际营养; 施肥与环境; 施肥与农产品品质; 农业生物学和生物化学应用; 肥料的新剂型新品种的研制、应用及作用机理; 本学科领域中新手段、新方法的研究以及与本学科相关联的边缘学科等。双月刊, 大 16 开本 144 页, 单月 25 日出版, 定价 15 元, 全年 90 元。邮发代号: 82-169。在全国各地的邮局(所)可办理订阅, 漏订者可与编辑部联系。地址: 北京市中关村南大街 12 号, 中国农科院资源区划所《植物营养与肥料学报》编辑部, 邮编: 100081, 电话: 010-68918653, E-mail: zvyf@caas.ac.cn, zvyf@chinajournal.net.cn, http://zvyf.chinajournal.net.cn, http://www.iarp.cn。